

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

Detecting specific reaction types in micro-volume by cross-correlation and characterization of laser-excited fluorescence signals

Patent Number: DE19757740

Publication date: 1999-07-08

Inventor(s): EIGEN MANFRED PROF DR (DE); WINKLER THORSTEN DR (DE); BIESCHKE JAN (DE); DOERRE KLAUS (DE); KETTLING ULRICH (DE); SCHWILLE PETRA (DE); STEPHAN JENS (DE); KOLTERMANN ANDRE (DE)

Applicant(s): EVOTEC BIOSYSTEMS AG (DE)

Requested Patent: ☐ DE19757740

Application Number: DE19971057740 19971223

Priority Number (s): DE19971057740 19971223

IPC Classification: G01J3/457 ; G01N33/48 ; G01N33/52 ; G01N33/58 ; G01N21/64 ; G01N33/68 ; G01N15/04 ; C12Q1/68

EC Classification: G01N21/64

Equivalents:

Abstract

Two or more analytes of the sample are marked with different fluorescent dyes. A laser excites fluorescence and two detectors (or more) receive this light from a volume V and numbers of signals in a section and/or intervals between them are determined. Two or more analytes of the sample are marked with different fluorescent dyes. Alternatively, its single analyte is marked with two or more fluorescent dyes. A laser excites fluorescence, and two detectors (or more) receive this light from a volume V. Their signals are chopped into sections and numbers of signals in a section and/or intervals between them are determined. Signal sections from both detectors are subjected to coincidence analysis. From the statistics generated, features characteristic of molecular association, dissociation, chaining, cracking or reconfiguration are assessed.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

Detecting specific reaction types in micro-volume by cross-correlation and characterization of laser-excited fluorescence signals

Patent Number: DE19757740

Publication
date: 1999-07-08

Inventor(s): EIGEN MANFRED PROF DR (DE); WINKLER THORSTEN DR (DE); BIESCHKE JAN (DE); DOERRE KLAUS (DE); KETTLING ULRICH (DE); SCHWILLE PETRA (DE); STEPHAN JENS (DE); KOLTERMANN ANDRE (DE)

Applicant(s): EVOTEC BIOSYSTEMS AG (DE)

Requested
Patent: ☐ DE19757740

Application
Number: DE19971057740 19971223

Priority Number
(s): DE19971057740 19971223

IPC
Classification: G01J3/457 ; G01N33/48 ; G01N33/52 ; G01N33/58 ; G01N21/64 ; G01N33/68 ; G01N15/04 ; C12Q1/68

EC
Classification: G01N21/64

Equivalents:

Abstract

Two or more analytes of the sample are marked with different fluorescent dyes. A laser excites fluorescence and two detectors (or more) receive this light from a volume V and numbers of signals in a section and/or intervals between them are determined. Two or more analytes of the sample are marked with different fluorescent dyes. Alternatively, its single analyte is marked with two or more fluorescent dyes. A laser excites fluorescence, and two detectors (or more) receive this light from a volume V. Their signals are chopped into sections and numbers of signals in a section and/or intervals between them are determined. Signal sections from both detectors are subjected to coincidence analysis. From the statistics generated, features characteristic of molecular association, dissociation, chaining, cracking or reconfiguration are assessed.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19) BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

(12) Patentschrift
(10) DE 197 57 740 C 2

(51) Int. Cl.⁷:
G 01 J 3/457
G 01 N 33/48
G 01 N 33/52
G 01 N 33/58
G 01 N 21/64

(21) Aktenzeichen: 197 57 740.7-52
(22) Anmeldetag: 23. 12. 1997
(43) Offenlegungstag: 8. 7. 1999
(45) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 13. 4. 2000



DE 197 57 740 C 2

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

- (73) Patentinhaber:
EVOTEC BioSystems AG, 22525 Hamburg, DE
- (74) Vertreter:
Patentanwälte von Kreisler, Selting, Werner, 50667 Köln
- (72) Erfinder:
Eigen, Manfred, Prof.Dr., 37077 Göttingen, DE;
Winkler, Thorsten, Dr., 37077 Göttingen, DE;
Stephan, Jens, 37077 Göttingen, DE; Schwille,
Petra, 37077 Göttingen, DE; Koltermann, Andre,
37077 Göttingen, DE; Kettling, Ulrich, 37077
Göttingen, DE; Dörre, Klaus, 37077 Göttingen, DE;
Bieschke, Jan, 37077 Göttingen, DE
- (56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:

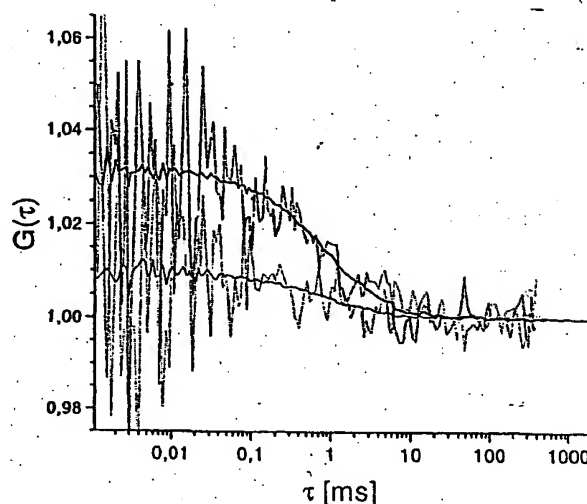
EP 07 31 173 A2
WO 94 16 313 A2

EIGEN, M., RIGLER, R.: Sorting Single molecules:
Application to diagnostics and evolutionary
biotechnology, in: Proc. Natl. Acad. Sci. USA,
Vol.91, June 1994, pp.5740-5747;
SCHWILLE, P., et al.: Dual-Color Fluorescence
Cross-Correlation Spectroscopy for Multicompo-
nent Diffusional Analysis in Solution, in: Bio-
physical Journal, Vol.72, April 1997, pp.1878 -
1886;
TELLINGHUISEN, J., et al.: Analysis of Fluores-
cence Lifetime Data for Single Rhodamine Mole-
cules in Flowing Sample Streams, in: Analytical
Chemistry, 66, No.1, January 1, 1994, pp.64-72;
KELLER, R.A., et al.: Single-Molecule Fluores-
cence Analysis in Solution, in: Applied Spectros-
copy, Vol.50, No.7, 1996, pp.12A-32A;

(54) Verfahren zum Nachweis von Assoziations-, Dissoziations-, Verknüpfungs- oder Spaltreaktionen sowie Konformationsänderungen mittels Koinzidenzanalyse

- (57) Verfahren zum Nachweis von Assoziations-, Dissoziations-, Verknüpfungs- oder Spaltreaktionen sowie Konformationsänderungen von Analyten in einer Probe mittels Koinzidenzanalyse, wobei
- die Probe mindestens zwei mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Analyte oder einen mit mindestens zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierten Analyten enthält,
 - die Probe zur Anregung der Fluoreszenzemission der mindestens zwei Farbstoffe von mindestens einem Laser beleuchtet wird,
 - die von der Probe ausgehenden, aus mindestens einem Meßvolumenelement V stammenden Fluoreszenzsignale mittels mindestens zweier Detektionseinheiten detektiert werden,
 - die jeweils in den Detektionseinheiten detektierten Signale in beliebige Zeitabschnitte zerlegt werden,
 - die Anzahl der in mindestens einem Zeitabschnitt enthaltenen Signale und/oder die Zeitintervalle zwischen Signalen in den Zeitabschnitten ermittelt werden,
 - für mindestens einen Zeitabschnitt der ersten Detektionseinheit eine Koinzidenzanalyse der ermittelten Daten mit mindestens einem Zeitabschnitt der zweiten Detektionseinheit durchgeführt wird, wobei die Koinzidenzanalyse eine Kreuzkorrelation unter Ermittlung der Kreuzkorrelationsamplitude $G(0)$ und/oder eine logische UND-Verknüpfung beinhaltet,
 - mindestens eine Statistik der Resultate der Koinzidenzanalyse erstellt wird und/oder die Resultate einer Schwellenwertanalyse unterzogen werden,
 - diese oder mindestens eine Kombination mehrerer Statistiken nach dem Vorhandensein von Merkmalen, welche

für eine Assoziations-, Dissoziations-, Verknüpfungs- oder Spaltreaktion oder Konformationsänderungen charakteristisch sind, bewertet wird.



DE 197 57 740 C 2

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Assoziations-, Dissoziations-, Verknüpfungs- oder Spaltreaktionen sowie Konformationsänderungen mittels Koinzidenzanalyse.

- 5 Das Auffinden von Molekülen mit spezifischen Eigenschaften, wie Bindungs-, Inhibitions- oder katalytischen Eigenschaften, ist eine zentrale Aufgabe in der Wirkstoffentwicklung und in biotechnologischen Anwendungen. Moleküle mit derartigen Eigenschaften können entweder entdeckt oder entworfen werden. In diesem Sinne bedeutet "Entdecken" die Isolierung und das Screening von Substanzen, während das molekulare Design auf rationale oder evolutive Techniken zurückgreift. Das rationale Design erfordert fundierte Einblicke in die molekulare Biophysik, um eine Vorhersage der
10 Struktur-Funktion-Beziehung zu ermöglichen. Im Gegensatz dazu werden im evolutiven Design Prinzipien der Darwin'schen Evolution auf molekularer Ebene angewendet und neue bzw. veränderte Moleküle durch eine Kombination von Mutation, Amplifikation und Selektion erzeugt. Die Anwendung evolutiver Techniken in der Biotechnologie – sog. evolutive Biotechnologie – wurde von Eigen und Gardiner zu Beginn der achtziger Jahre vorgeschlagen und hat inzwischen eine breite Akzeptanz gefunden. Leider ist jedoch in vielen evolutiven Ansätzen der Prozeß der Selektion nicht unmittelbar an die Amplifikation geknüpft. Selektionsprozesse müssen daher oftmals künstlich eingeführt werden. Dies kann beispielsweise im sog. Hochdurchsatzscreening (HTS) in Kombination mit einem geeigneten Assay erfolgen.

- HTS-Prozesse unterliegen ökonomischen Beschränkungen. Zur Prozessierung einer Vielzahl von Proben ist es daher erforderlich, daß die Analysezeit der einzelnen Probe extrem gering ist. In den letzten Jahren erfolgten daher große Anstrengungen in der Miniaturisierung, Parallelisierung und Automation der Screeningtechnologie sowie in der Entwicklung von homogenen Assays und der Integration hochsensitiver und schnellarbeitender Detektionsvorrichtungen. Unter
20 der Vielzahl alternativer Detektionsprinzipien haben fluoreszenzbasierende Techniken – wie FRET, Quenching, Fluoreszenzpolarisation, zeitaufgelöste Fluoreszenztechniken und Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) – starken Anklang gefunden.

- Im Rahmen der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie werden Fluoreszenzfluktuationen von einzelnen Molekülen eines insbesondere im Femtoliter-Bereich liegenden Meßvolumenelementes gemessen und durch Evaluierung der Autokorrelationsfunktion der Einfarben-Fluoreszenzsignale molekulare Diffusionscharakteristiken ermittelt. Die Grundlagen der FCS und ihre Anwendung auf insbesondere biologische Fragestellungen sind in vielfältigen Artikeln und Patentanmeldungen beschrieben (z. B. Eigen und Rigler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 5740–5747, 1994, WO 94/16313).

- Die Fluoreszenz Kreuzkorrelationsspektroskopie oder sog. Zweifarben-FCS ist ebenfalls Gegenstand einiger Veröffentlichungen. Die Zweifarben-FCS wurde zu Beginn der neunziger Jahre von Eigen und Rigler (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 5740–5747) vorgeschlagen und wird ebenfalls in der unter WO 94/16313 veröffentlichten internationalen Patentanmeldung erörtert. Applikationen dieser Technik bei der Untersuchung von Hybridisierungskinetiken wurden von Schwille et al. (Biophysical Journal, Vol. 72, 1878–1886, 1997) beschrieben.

- Die in der Literatur beschriebenen Anwendungen der Fluoreszenz Kreuzkorrelation zeigen, daß bislang Analysezeiten von 30 bis 120 s notwendig sind, um eine hinreichend genaue Bestimmung der Kreuzkorrelationsamplituden und Diffusionszeiten zu ermöglichen. Derartig lange Analysezeiten sind nicht oder nur bedingt für ein Hochdurchsatzscreening geeignet. Es bedarf somit Verbesserungen der Signalprozessierung.

In der Literatur sind ferner verschiedene Signalverarbeitungsverfahren beschrieben worden, um Signale vom Hintergrundrauschen zu trennen.

- 40 In Tellinghuisen et al. (Analytical Chemistry 66, No. 1, 64–72, 1994) wird ein Verfahren für die Fluoreszenz-Lebensdauerspektroskopie beschrieben, das dazu dienen soll, die von der Lichtquelle, in diesem Fall von einem Laser stammenden Photonen aus dem Gesamtsignal herauszufiltern. Dazu wird der Signalförderstrom mit dem Triggersignal, d. h. dem Anregungspuls des gepulsten Lasers, verglichen. Kommt ein Photon im Rahmen der Lichtgeschwindigkeit zeitgleich mit dem Anregungspuls an, so wird es als Streulichtpuls identifiziert und gelöscht.

- 45 in Keller et al. (Applied Spectroscopy 50, No. 7, 12A–32A, 1996) wird ein weiteres Verfahren für die Analyse von Fluoreszenzlebensdauern beschrieben. In diesem Verfahren werden die Zeitdifferenzen zwischen am Detektor eintreffenden, zeitlich aufeinanderfolgenden Impulsen bestimmt, indem die Anzahl von Triggerpulsen, die mit 100 kHz erzeugt werden, zwischen zwei aufeinanderfolgenden Photonen gezählt wird. Diese Zahlen werden in aufeinander folgenden Kanälen eines MCS (engl. "multichannel scaler") gespeichert. Anschließend wird dieses MCS-Signal einer zeitlichen, schnellen Fouriertransformation (FFT) zur Glättung unterworfen. Liegen nach der FFT wenigstens 5 Zeitdifferenzen des geglätteten Signals unterhalb eines visuell bestimmten Schwellenwertes, so wird das Signal für die gesamte Zeitdauer, während der die Zeitdifferenzen kontinuierlich unterhalb des visuell bestimmten Schwellenwertes liegen, als zusammengehörig erachtet und als Fluoreszenzanteil, im wissenschaftlichen Sprachgebrauch seit einiger Zeit "burst" genannt, bewertet. Anschließend wird das so gefilterte Signal in bezug auf die Fluoreszenzlebensdauer ausgewertet. Allerdings verwenden die Autoren hier nur Signalanteile, bei denen mehr als 25 Zeitdifferenzen unterhalb des visuell bestimmten
55 Schwellenwertes liegen.

Aufgabe der folgenden Erfindung ist es, ein Verfahren bereitzustellen, welches eine zuverlässige und schnelle Detektion von Assoziations-, Dissoziations-, Verknüpfungs- und Spaltreaktionen sowie Konformationsänderungen ermöglicht.

- 60 Die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren mit den Merkmalen des Patentanspruchs 1. Die weiteren Patentansprüche betreffen bevorzugte Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens. Die Erfindung betrifft somit ein Verfahren zum Nachweis von Assoziations-, Dissoziations-, Verknüpfungs- oder Spaltreaktionen sowie Konformationsänderungen von Analyten in einer Probe mittels Koinzidenzanalyse, wobei

- 65 – die Probe mindestens zwei mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Analyte oder einen mit mindestens zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierten Analyten enthält,
– die Probe zur Anregung der Fluoreszenzemission der mindestens zwei Farbstoffe von mindestens einem Laser beleuchtet wird,

- die von der Probe ausgehenden, aus mindestens einem Meßvolumenelement V stammenden Fluoreszenzsignale mittels mindestens zweier Detektionseinheiten detektiert werden,
- die jeweils in den Detektionseinheiten detektierten Signale in beliebige Abschnitte zerlegt werden,
- die Anzahl der in mindestens einem Zeitabschnitt enthaltenen Signale und/oder die Zeitintervalle zwischen Signalen in den Zeitabschnitten ermittelt werden,
- für mindestens einen Zeitabschnitt der ersten Detektionseinheit eine Koinzidenzanalyse der ermittelten Daten mit mindestens einem Zeitabschnitt der zweiten Detektionseinheit durchgeführt wird, wobei die Koinzidenzanalyse eine Kreuzkorrelation unter Ermittlung der Kreuzkorrelationsamplitude $G(0)$ und/oder eine logische UND-Verknüpfung beinhaltet,
- mindestens eine Statistik der Resultate der Koinzidenzanalyse erstellt wird, und/oder die Resultate einer Schwellenwertanalyse unterzogen werden,
- diese oder mindestens eine Kombination mehrerer Statistiken nach dem Vorhandensein von Merkmalen, welche für eine Assoziations-, Dissoziations-, Verknüpfungs- oder Spaltreaktion oder Konformationsänderungen charakteristisch sind, bewertet wird.

In einer bevorzugten Ausführungsform beträgt das Meßvolumenelement V weniger als 10^{-12} l.

Es ist weiterhin bevorzugt, daß die Detektionseinheiten unterschiedliche spektrale Detektionsempfindlichkeiten aufweisen.

Insbesondere kann im Rahmen der Koinzidenzanalyse die Koinzidenz durch Kreuzkorrelation und/oder logische UND-Verknüpfung ermittelt werden. Bei der Kreuzkorrelation ist es bevorzugt, die Amplitude $G(0)$ zu bestimmen. Es ist jedoch auch möglich, die Amplitude $G(\tau)$ für die Koinzidenzanalyse heranzuziehen.

Es kann weiterhin bevorzugt sein, die Probe mittels eines Lesers zu beleuchten, der elektromagnetische Strahlung mindestens einer Wellenlänge emittiert, die geeignet ist, die mindestens zwei in der Probe enthaltenen Farbstoffe anzuregen. Es ist jedoch auch möglich, Laser zu verwenden, die mehr als eine Wellenlänge emittieren, oder mehrere Laser zur Anregung der Fluoreszenzemission einzusetzen.

Abhängig von der gewünschten Toleranz für falsch-positive bzw. falsch-negative Resultate ist es möglich, mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens unter Verwendung der Kreuzkorrelationsanalyse Analysezeiten im Bereich von 1 bis 2 s zu erzielen. Schnellere Analysen können durch eine on-line Evaluierung der Kreuzkorrelationsdaten ermöglicht werden. Das Korrelationsverfahren ist ein Echtzeitprozeß, so daß ein on-line Fitting während des Korrelationsverfahrens möglich ist. Im Falle des Screenings auf Restriktionsendonukleaseaktivität sollten i. d. R. die meisten Proben negativ sein, da eine spezifische Enzymaktivität in einer beliebigen Library ein relatives seltenes Ereignis darstellt. Obwohl die Verteilungsfunktionen der negativen Proben bei Analysezeiten von 760 ms relativ breit sind, können dennoch Zweidrittel klar von positiven Referenzen unterschieden werden (siehe Fig. 5). Bei Verwendung einer Gauss'schen Funktion für positive Proben und Festsetzung einer Toleranzschwelle, welche die Anzahl nichtidentifizierter positiver Proben in einem Screeninglauf definiert, kann ein Schwellenwert für $G(0)$ für eindeutig negative Proben definiert werden. Alle Proben mit einem $G(0)$ -Wert unterhalb dieses Schwellenwertes können unmittelbar einer weiteren Analyse mit derselben Analysezeit zugeführt werden. Es resultiert somit eine verdoppelte Analysezeit, für die wiederum ein Schwellenwert definiert wird. Da die Verteilungsfunktionen bei Analysezeiten von 1.6 ms signifikant besser separiert sind, werden die meisten Proben als falsch-positive identifiziert. Positive Proben werden nochmaligen Analysen zugeführt, bis die gewünschte Signifikanz erreicht ist. Es ist somit möglich, mit im Einzelfall zu bestimmenden Analysezeiten unter Zugrundelegen eines gewünschten Signifikanzniveaus eine adaptive Auswertung durchzuführen.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es nicht zwingend notwendig, eine Korrelation durchzuführen, wie es eine fundamentale Voraussetzung für die Einfarben-FCS ist. Die Zweifarben-Fluoreszenzkreuzkorrelation ist unabhängig von Massenunterschieden und basiert auf der Identifikation von Fluktuationen, die simultan in zwei Detektionskanälen auftreten. Die Koinzidenzanalyse kann somit durch ein logisches UND bzw. Multiplikationsglied auf Hardwareebene realisiert werden.

Ein besonders hervorzuhebender Vorteil für die Entwicklung von homogenen Assays auf der Basis des erfindungsgemäßen Verfahrens, insbesondere unter Anwendung der Zweifarben-Fluoreszenzkreuzkorrelationsanalyse, ist die generelle Anwendbarkeit und Flexibilität der Methode. Das Targetdesign für konventionelle Einfarben-FCS ist limitiert durch die Notwendigkeit, positive und negative Proben über die Diffusionszeiten der fluoreszenten Moleküle zu unterscheiden. Andere Fluoreszenztechniken wie FRET oder Fluoreszenzquenching sind dadurch eingeschränkt, daß zwei Fluorophore sich in geeigneter räumlicher Nähe zueinander befinden müssen. Sie können jedoch zum Nachweis von Konformationsänderungen durchaus geeignet sein. Fluoreszenzpolarisation erfordert eine veränderte Fluorophorflexibilität, um eine Reaktion detektieren zu können. Auf dem erfindungsgemäßen Verfahren basierende Assays unterliegen nicht diesen Limitationen. Das Screening auf enzymatische Aktivität sowie auch auf Inhibitoren enzymatischer Prozesse wird entscheidend vereinfacht. Unter Anwendung der Prinzipien der evolutiven Biotechnologie in Kombination mit dem erfindungsgemäßen Verfahren und neuen Mutagenesetechniken eröffnen sich Möglichkeiten für das Design bzw. die Optimierung einer Vielzahl katalytischer Funktionen.

Das erfindungsgemäße Verfahren und seine Ausführungsformen zeichnen sich durch folgende Vorteile aus:

Bei Erzeugung eines zweifarbenen Anregungslichtes in nur einer Lichtquelle wird ein geringerer Justageaufwand erforderlich. Es ergibt sich eine Erhöhung der Stabilität bezüglich der Deckungsgleichheit der beiden konfokalen Volumenelemente. Störende Wellenlängen außerhalb der spektralen Anregungsbereiche bzw. innerhalb der Emissionsbereiche der beiden Marker-Fluorophore können durch geeignete optische Filter herausgefiltert werden. Eine Anpassung der relativen Intensitäten und Strahldurchmesser für beide Farben kann ebenfalls unter Verwendung geeigneter Filter erfolgen.

Unter Verwendung einer flexiblen on-line Auswertung lassen sich sehr kurze Untersuchungszeiten je Einzelprobe von < 1 s erzielen. Die Meßzeit für positive Proben läßt sich zyklisch verlängern, so daß Probencharakterisierung und Validierung in das Screening integriert werden. Die Minimierung der Untersuchungszeit jeder Einzelprobe führt zu einer Op-

timierung der Gesamtuntersuchungszeit im Screening. Erfindungsgemäß ist eine Reduktion der Auswertung von Korrelationsdaten auf die Korrelationsamplitude bei gleichzeitiger starker Einschränkung der freien Fitparameter möglich.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren läßt sich die Substratkonzentration bis in den subpikomolaren Bereich verringern.

5 Fig. 1 zeigt typische Kreuzkorrelationskurven, die von Proben mit bzw. ohne Restriktionsendonukleaseaktivität bei verschiedenen Analysezeiten erhalten wurden.

Fig. 2 zeigt die Mittelwerte der jeweiligen einzelnen Kreuzkorrelationspunkte und ihre Standardabweichungen, die von Proben mit bzw. ohne Restriktionsendonukleaseaktivität erhalten wurden.

Die in Fig. 3 dargestellten Histogramme zeigen die Verteilungen der evaluierten Kreuzkorrelationsamplituden $G(0)$, die von Proben mit bzw. ohne Restriktionsendonukleaseaktivität unter Verwendung von Lochblenden unterschiedlichen Durchmessers erhalten wurden.

Fig. 4 verdeutlicht den Einfluß der Substratkonzentration auf den Überlapp zwischen den Verteilungsfunktionen von Proben mit und ohne enzymatische Aktivität.

Fig. 5 zeigt die Applikation des erfindungsgemäßen Verfahrens für ein simuliertes Hochdurchsatzscreening auf Restriktionsendonukleaseaktivität.

Fig. 6 verdeutlicht eine bevorzugte Ausführungsform des optischen Aufbaus unter Verwendung eines Zweifarben-Fluoreszenzkreuzkorrelationsspektrometers.

Fig. 1 zeigt typische Kreuzkorrelationskurven, die von Proben mit bzw. ohne Restriktionsendonukleaseaktivität bei verschiedenen Analysezeiten erhalten wurden. Die Assays wurden unter Verwendung von 10 nM markiertem DNA-Substrat, welches für 3 Stunden bei 37°C mit 0.25 U/µl EcoRI (untere dünne Linien) bzw. ohne Zusatz von Enzym (obere Linien in Fettdruck) inkubiert wurde, durchgeführt. Die Korrelationszeiten betrugen 760 ms (gepunktete Linien) und 120 s (durchgezogene Linien). Die verwendete Lochblende wies einen Durchmesser von 30 µm auf. Die Anregungsintensitäten betrugen 19 kW/cm² (488 nm) bzw. 15 kW/cm² (633 nm). Die bei kurzen Analysezeiten erhaltene Kreuzkorrelationskurve ist verrauschter als die bei langen Analysezeiten erhaltene Kreuzkorrelationskurve. Dennoch stimmen die charakteristischen Diffusionszeiten und Partikelzahlen hinreichend überein, um die Aussage zu erlauben, daß die erhaltenen Kurven dieselbe Information enthalten.

Fig. 2 zeigt die Mittelwerte der jeweiligen einzelnen Kreuzkorrelationswerte τ und ihre Standardabweichungen, die von Proben mit bzw. ohne Restriktionsendonukleaseaktivität erhalten wurden. Die Assays wurden unter Verwendung von 1 nM markiertem DNA-Substrat, welches für 3 Stunden bei 37°C mit 0.25 U/µl EcoRI (untere dünne Linie) bzw. mit 0.25 U/µl HindIII (obere Linie in Fettdruck) inkubiert wurde, durchgeführt. Die Korrelationszeiten betrugen 1.6 s. Die verwendete Lochblende wies einen Durchmesser von 30 µm auf. Die Anregungsintensitäten betrugen 38 kW/cm² (488 nm) bzw. 31 kW/cm² (633 nm). Es zeigt sich, daß die Standardabweichungen bei τ -Werten unterhalb von 0.01 ms drastisch erhöht sind.

Die in Fig. 3 dargestellten Histogramme zeigen die Verteilungen der evaluierten Kreuzkorrelationsamplituden $G(0)$, die von Proben mit bzw. ohne Restriktionsendonukleaseaktivität unter Verwendung von Lochblenden unterschiedlichen Durchmessers erhalten wurden. Die Balken bezeichnen die Anzahl der $G(0)$ -Werte, die in einer Binweite von 0.0015 (30 µm), 0.0026 (10 µm) bzw. 0.00062 (60 µm) liegen. Der Hauptteil der Abbildung zeigt die Verteilungsfunktionen von Proben mit (gepunktete Balken) bzw. ohne (durchgezogene Balken) enzymatischer Aktivität bei optimalem Lochblendendurchmesser (30 µm); der Überlapp zwischen den Gauss-Kurven beträgt hier 0.6%. Er beträgt 2.4% bei einem Lochblendendurchmesser von 10 µm bzw. 3.4% bei einem Lochblendendurchmesser von 60 µm. Die Assays wurden unter Verwendung von 10 nM gelabeltem DNA-Substrat durchgeführt, welches für 3 Stunden bei 37°C mit 0.25 U/µl EcoRI (gepunktete Balken) bzw. mit 0.25 U/µl HindIII (durchgezogene Balken) inkubiert wurde. Die Korrelationszeiten betrugen 1.6 s. Die Anregungsintensitäten betrugen 38 kW/cm² (488 nm) bzw. 31 kW/cm² (633 nm). Der ermittelte optimale Lochblendendurchmesser reflektiert offenbar den Kompromiß zwischen der Zunahme der Detektionseffizienz mit zunehmendem Lochblendendurchmesser (bedingt durch eine erhöhte Aufenthaltsdauer der Fluorophore im Fokus) und der Abnahme des Signal-Rausch-Verhältnisses mit zunehmendem Lochblendendurchmesser (bedingt durch einen erhöhten Fluoreszenzuntergrund).

Fig. 4 verdeutlicht den Einfluß der Substratkonzentration auf den Überlapp zwischen den Verteilungsfunktionen von Proben mit und ohne enzymatische Aktivität. Die Assays wurden wie in der Legende zu Fig. 3 beschrieben unter Verwendung eines Lochblendendurchmessers von 30 µm durchgeführt. Die Separation der Verteilungsfunktionen erhöhte sich mit zunehmender Konzentration.

Fig. 5 zeigt die Applikation des erfindungsgemäßen Verfahrens für ein simuliertes Hochdurchsatzscreening auf Restriktionsendonukleaseaktivität. Die Proben wurden zyklisch gescreent (insgesamt 500 Messungen). Der linke Teil der Fig. 5 zeigt die Verteilungsfunktionen von Proben mit (BamHI, offene Balken) und ohne (HindIII, schwarze Balken) spezifische Endonukleaseaktivität bei Analysedauern von 760 ms (1a), 1.6 s (2a), 3.6 s (3a) und 7.6 s (4a). Die Verteilungsfunktionen der Kreuzkorrelationsamplituden $G(0)$ wurden wie in der Legende zu Fig. 3 beschrieben evaluiert. Die Binweite betrug 0.0015. Der rechte Teil der Fig. 5 verdeutlicht die Separationseffizienz des erfindungsgemäßen Verfahrens mittels Gauss-Fitting bei reinem Substrat (durchgezogene Linie), HindIII (durchgezogene Linie in Fettdruck), BamHI (gepunktete Linie in Fettdruck), EcoRI (gepunktete Linie) und Sspl (gestrichelte Linie). Der Überlapp betrug 2.6–5.4% (760 ms), 0.1% (1.6 s), < 0.002% (3.6 s) bzw. < 10⁻⁵% (7.6 s). Die Assays wurden in einem Volumen von 5 µl unter Verwendung von 10 nM gelabeltem DNA-Substrat durchgeführt, welches für 3 Stunden bei 37°C mit 0.25 U/µl HindIII, 0.1 U/µl BamHI, 0.25 U/µl EcoRI, 0.08 U/µl Sspl bzw. ohne Zugabe von Enzym inkubiert wurde. Die Anregungsintensitäten betrugen 19 kW/cm² (488 nm) und 15 kW/cm² (633 nm). Der Lochblendendurchmesser betrug 30 µm. Es zeigt sich, daß mit zunehmender Analysezeit die Verteilungsfunktionen schmäler wurden und somit die Mittelwerte klar zu separieren sind.

Fig. 6 zeigt den optischen Aufbau eines Zweifarben-Fluoreszenzkreuzkorrelationsspektrometers. Zwei parallele Laserstrahlen eines Argon-Ionen-Lasers (488 nm) und eines Helium-Neon-Lasers (633 nm) passieren ein Wasserimmersionsobjektiv (40x, N.A. = 1.2) in einem Epi-Illuminationsaufbau, so daß die zwei übereinandergelagerten Foci in der

Probe ein konfokales Meßvolumenelement in der Größenordnung von Femtolitern bilden. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird durch das Mikroskopobjektiv gesammelt, mittels dichroitischen Spiegel vom Anregungsstrahlengang separiert und mittels einer Linse auf eine Lochblende fokussiert. Die Lochblende variablen Durchmessers ist in der Bildebene der Linse angeordnet und kann in x-, y- und z-Richtung justiert werden. Die Fluoreszenzemission wird parallelisiert, durch einen dichroitischen Spiegel in eine grüne und rote Fraktion separiert und auf zwei Avalanche-Photodioden refokussiert.

Ausführungsbeispiel 1

Verwendete Materialien:

Typ II Restriktionsendonukleasen (E.C. 3.1.21.4) EcoRI (25 U/µl), BamHI (10 U/µl), Sspl (8 U/µl) und HindIII (25 U/µl) wurden von der Fa. Stratagene (La Jolla, CA) erworben; die Enzymaktivitäten sind in Klammern angegeben. Fluoreszenzmarkierte 66 nt Oligonukleotide Cy5-ATGGCTAATGACCGAGAATAGGGATCCGAA TTCAA-TATTGGTACCTACGGGCTTTGCGCTCGTATC und RhG-GATACGAGCGCAAAGCCCGTAGGTACCAATATTGAATTCGGATCCCCTATTCTCG GTCATTAGCCAT wurden durch die Fa. MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und HPLC-gereinigt; das erste Oligonukleotid weist am 5'-Terminus als Fluoreszenzmarker Cy5 (Amersham, UK) auf, während das zweite Oligonukleotid mit Rhodamine Green RhG (Molecular Probes) gelabelt ist. Bei Hybridisierung der beiden komplementären Stränge ergeben sich Erkennungsstellen für BamHI (einfach unterstrichen), EcoRI (doppelt unterstrichen) und Sspl (gepunktet). Die Hybridisierung der komplementären Stränge erfolgte bei Konzentrationen von 1 µM in 100 mM KOAc, 25 mM Tris-Acetat, pH 7.6, 10 mM MgOAc, 0.5 mM β-Mercaptoethanol, 10 µg/ml BSA unter Erhitzen der Lösung auf 94°C und anschließendes Abkühlen auf 23°C mit einem Temperaturgradienten von 1.2 °C/min. Als Resultat entstand ein zweifach-markierter DNA-Doppelstrang mit Erkennungsstellen für BamHI, EcoRI und Sspl.

Homogener Restriktionsendonuklease-Assay:

Endonuklease-Assays wurden für 3 Stunden bei 37°C durchgeführt. Der Reaktionspuffer enthielt 150 mM KOAc, 37.5 mM Tris-Acetat, pH 7.6, 15 mM MgOAc, 0.75 mM β-Mercaptoethanol, 515 µg/ml BSA, 0.05% Triton X-100, 0.5% Glycerol, 1–20 nM getabelltes DNA-Substrat und überschüssige Anteile (0.08–0.25 U/µl) an Restriktionsenzymen BamHI, EcoRI, Sspl und HindIII.

Optischer Aufbau:

Die Messungen erfolgten unter Verwendung eines Zweifarben-Fluoreszenzkreuzkorrelationsspektrometers (Dual-color ConfoCor, C. Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Das konfokale Meßvolumen von 0.44 fl wurde durch Überlagerung der Foci eines Argon-Ionen-Lasers (488 nm) und eines Helium-Neon-Lasers (633 nm) gebildet. Die Fluoreszenzemissionssignale wurden separat unter Verwendung von zwei Avalanche-Photodioden detektiert; im Emissionsstrahlengang befand sich eine konfokal angeordnete Lochblende. Das Spektrometer war mit einem Thermostaten ausgestattet. Der Fokus wurde 100 µm über dem Boden des jeweiligen Probengefäßes positioniert. Die Meßtemperatur betrug 22°C. Die Proben wurden in Probenträgern im Mikrotiterplattenformat vorgelegt. Hierbei handelte es sich entweder um kontaminationsfrei verschlossene Plastikfolien (Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie) oder um kommerzielle Deckglaskammern (Nunc, Dänemark).

Kreuzkorrelationsanalyse:

Der theoretische Hintergrund der Kreuzkorrelationsanalyse wurde detailliert von Schwille et al. (Biophys. J. 72, 1878–1886, 1997) beschrieben. Auf den Offenbarungsgehalt dieser Publikation wird Bezug genommen. Die Daten der Kreuzkorrelation wurden unter Verwendung eines dreidimensionalen Modells für einzelne diffundierende Partikel evaluiert (Rigler und Widengren, Bioscience 3, 180–183, 1990):

$$G(\tau) = G(0) \cdot \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{Diff}} \right)^{-1} \cdot \left(1 + \frac{r_0^2 \tau}{z_0^2 \tau_{Diff}} \right)^{-\frac{1}{2}}$$

$G(0)$ bezeichnet die Korrelationsamplitude bei $\tau = 0$, welche proportional zur Konzentration zweifach-gelabelter Moleküle im zylindrischen Meßvolumen des Radius r_0 und der halben Länge z_0 ist. Der Parameter τ_{Diff} steht gemäß der Gleichung $\tau_{Diff} = r_0^2/4D$ in einem umgekehrt proportionalen Zusammenhang zum Diffusionskoeffizienten D . Die experimentellen Daten wurden unter Anwendung des Access 2.0 Programms der Fa. EVOTEC BioSystems GmbH mittels nichtlinearem Least-square Marquardt-Fit prozessiert. $G(0)$ war der einzige freie Parameter bei der Evaluierung der Kreuzkorrelationsmessungen. Der Strukturparameter z_0/r_0 wurde mittels Autokorrelationsmessungen an freier Farbstofflösung ermittelt; die durchschnittliche Diffusionszeit τ_{Diff} des Substrates wurde mittels einer 60 s Messung ohne Zusatz von Enzym bestimmt. Beide Parameter wurden im Fitting der Kreuzkorrelationsdaten vorgegeben.

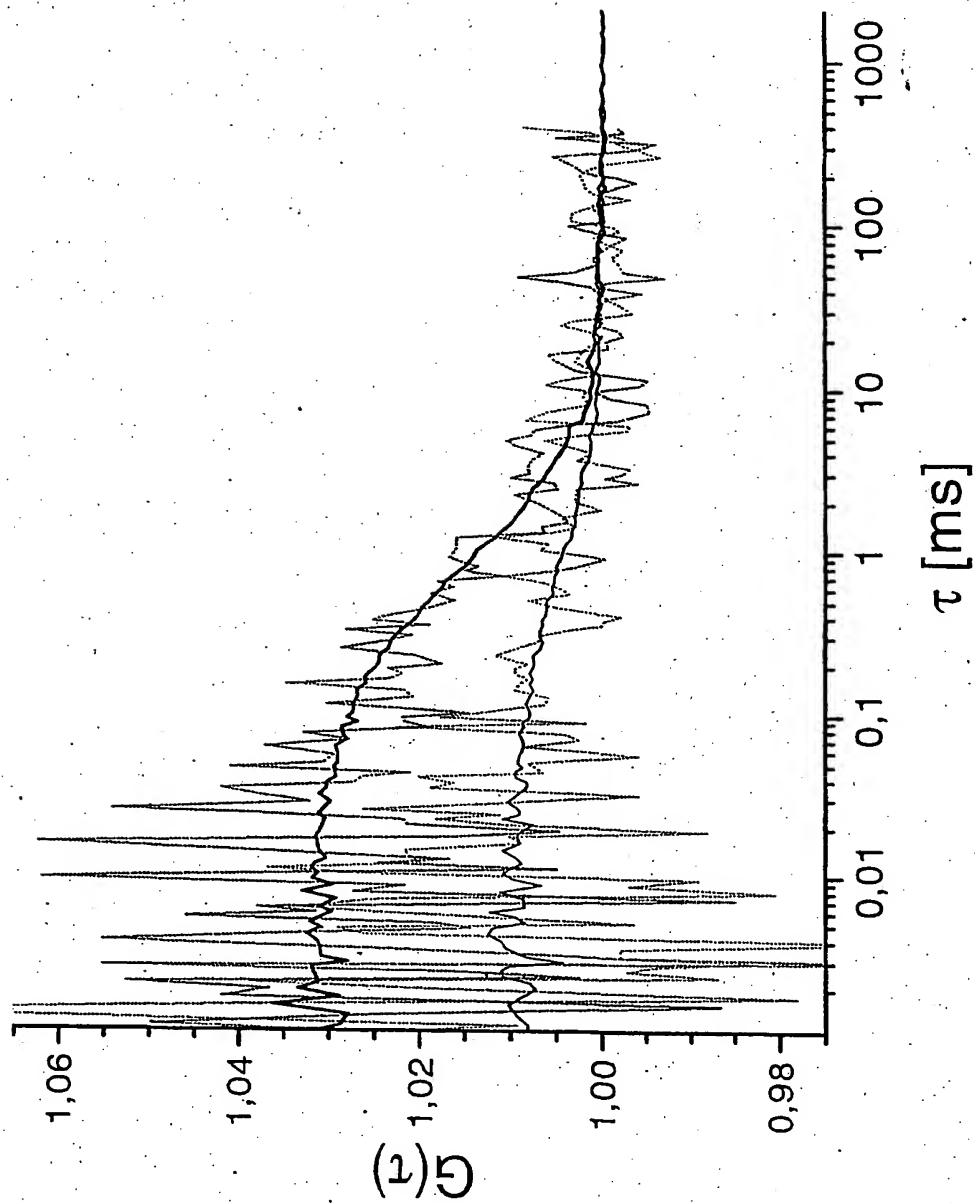
Statistische Evaluierung:

Ein typisches Set Kreuzkorrelationsmessungen enthielt 100 Kurven, welche unter Verwendung von Akkumulationszeiten zwischen 760 ms und wenigen Sekunden aufgenommen wurden. Aus jedem Set wurde die Amplitude $G(0)$, welche mittels Fitting erhalten wurde, in einem Histogramm aufgetragen (Details siehe Fig. 3). Die Analyse ergab, daß die $G(0)$ -Verteilungsfunktionen mittels Gauss-Funktion approximiert werden können. Die Mittelwerte der Gauss-Funktionen korrespondieren mit den durchschnittlichen Konzentrationen der Fluorophore, während die Standardabweichungen die Streuung der einzelnen Messungen widerspiegeln. Um ein Maß für die Unterscheidbarkeit der Verteilungsfunktionen zu erhalten, wurde die Überlappungsfläche der gefitteten Gauss-Funktionen durch Integration der Gauss-Funktionen ermittelt. Die Überlappungsflächen wurden standardisiert, so daß ein 100% Überlapp Gauss-Funktionen mit identischem Mittelwert und identischer Standardabweichung entspricht.

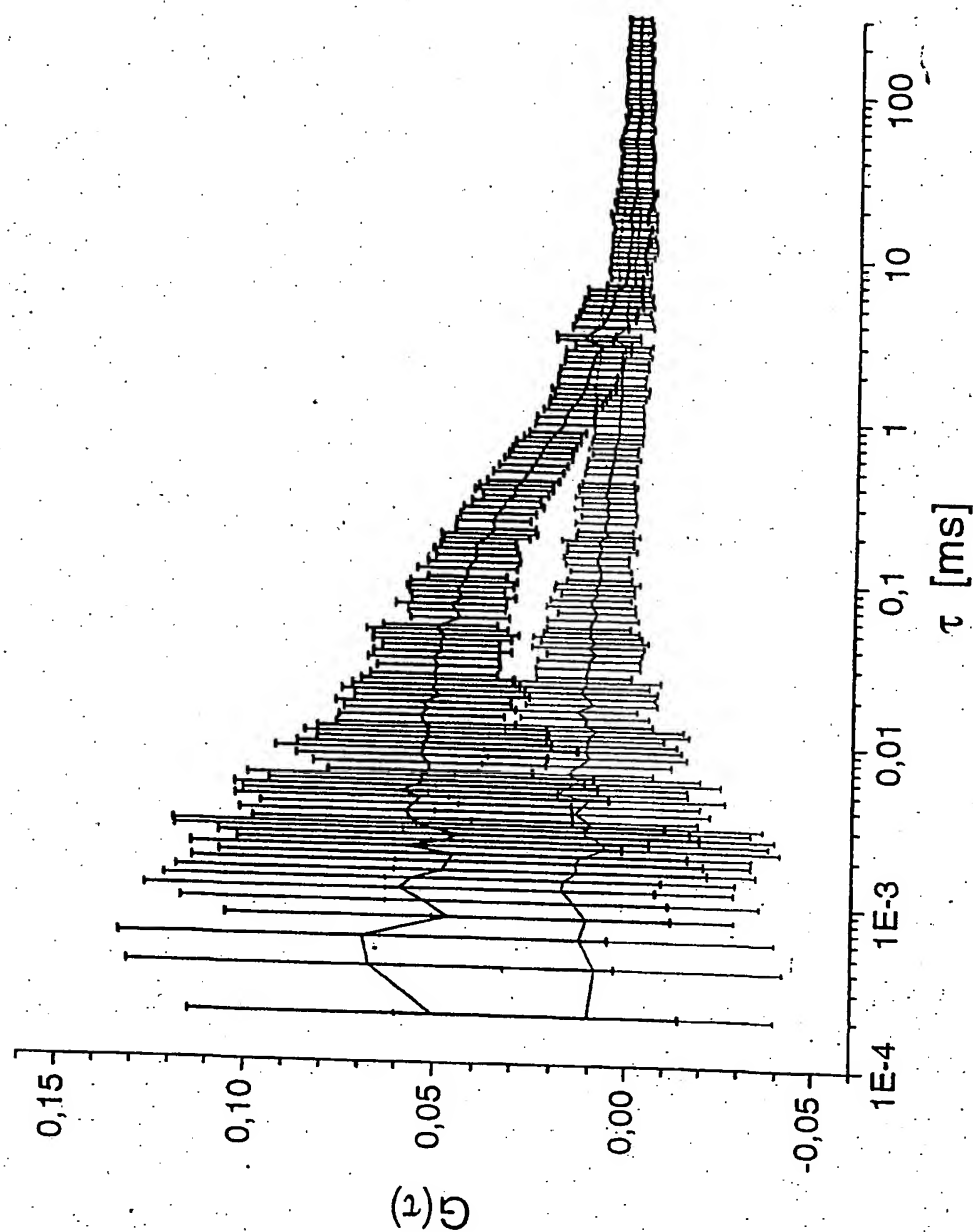
Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von Assoziations-, Dissoziations-, Verknüpfungs- oder Spaltreaktionen sowie Konformationsänderungen von Analyten in einer Probe mittels Koinzidenzanalyse, wobei
 - die Probe mindestens zwei mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Analyte oder einen mit mindestens zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierten Analyten enthält,
 - die Probe zur Anregung der Fluoreszenzemission der mindestens zwei Farbstoffe von mindestens einem Laser beleuchtet wird,
 - die von der Probe ausgehenden, aus mindestens einem Meßvolumenelement V stammenden Fluoreszenzsignale mittels mindestens zweier Detektionseinheiten detektiert werden,
 - die jeweils in den Detektionseinheiten detektierten Signale in beliebige Zeitabschnitte zerlegt werden,
 - die Anzahl der in mindestens einem Zeitabschnitt enthaltenen Signale und/oder die Zeitintervalle zwischen Signalen in den Zeitabschnitten ermittelt werden,
 - für mindestens einen Zeitabschnitt der ersten Detektionseinheit eine Koinzidenzanalyse der ermittelten Daten mit mindestens einem Zeitabschnitt der zweiten Detektionseinheit durchgeführt wird, wobei die Koinzidenzanalyse eine Kreuzkorrelation unter Ermittlung der Kreuzkorrelationsamplitude $G(0)$ und/oder eine logische UND-Verknüpfung beinhaltet,
 - mindestens eine Statistik der Resultate der Koinzidenzanalyse erstellt wird und/oder die Resultate einer Schwellenwertanalyse unterzogen werden,
 - diese oder mindestens eine Kombination mehrerer Statistiken nach dem Vorhandensein von Merkmalen, welche für eine Assoziations-, Dissoziations-, Verknüpfungs- oder Spaltreaktion oder Konformationsänderungen charakteristisch sind, bewertet wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Meßvolumenelement $V \leq 10^{-12}$ l ist.
3. Verfahren nach Ansprüchen 1 und/oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Detektionseinheiten unterschiedliche spektrale Detektionsempfindlichkeiten aufweisen.
4. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Probe von einem Laser beleuchtet wird, der elektromagnetische Strahlung mehrerer Wellenlängen emittiert.
5. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Probe von mehreren Lasern beleuchtet wird.
6. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß eine flexible on-line Auswertung verwendet wird.

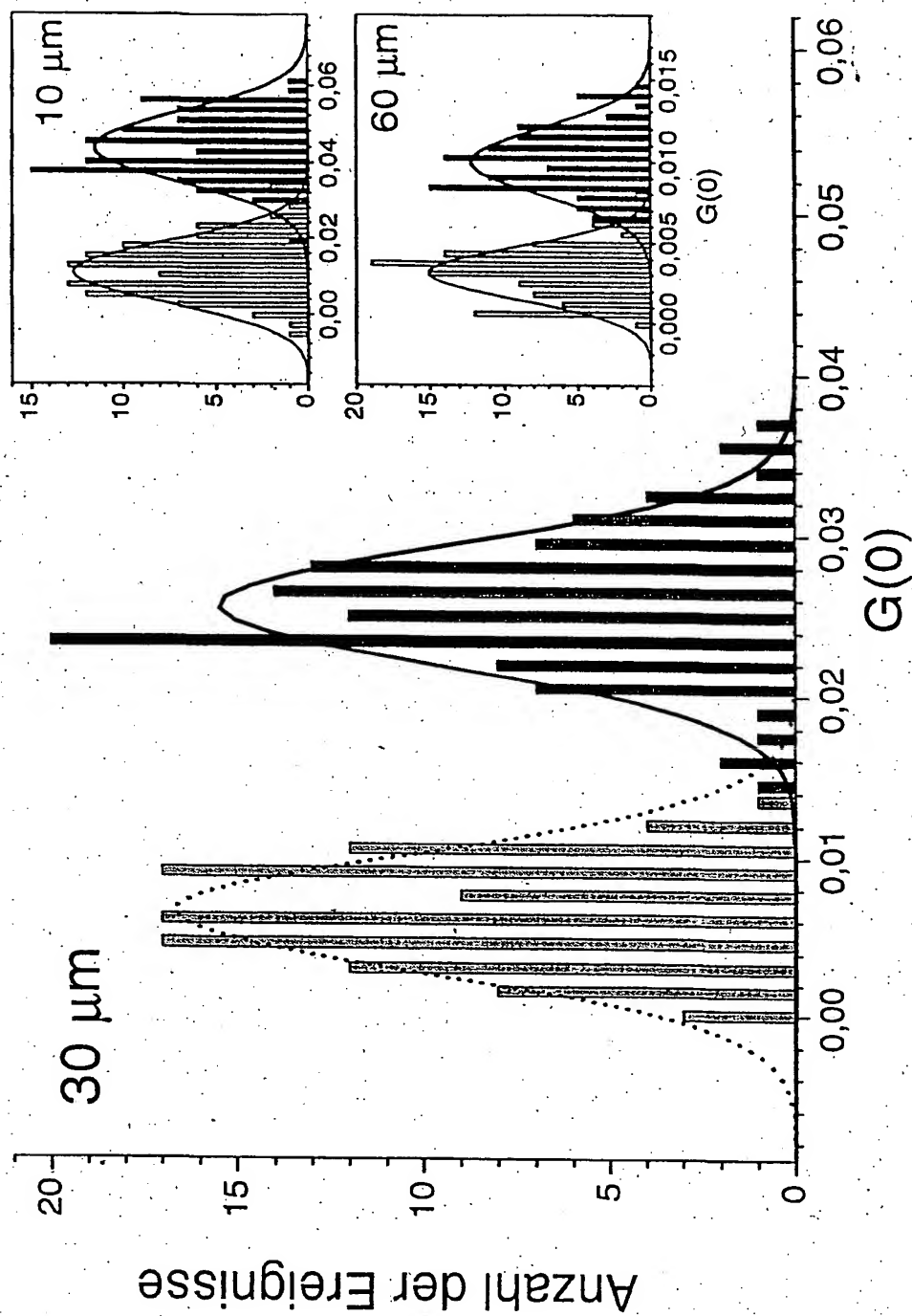
Hierzu 6 Seite(n) Zeichnungen



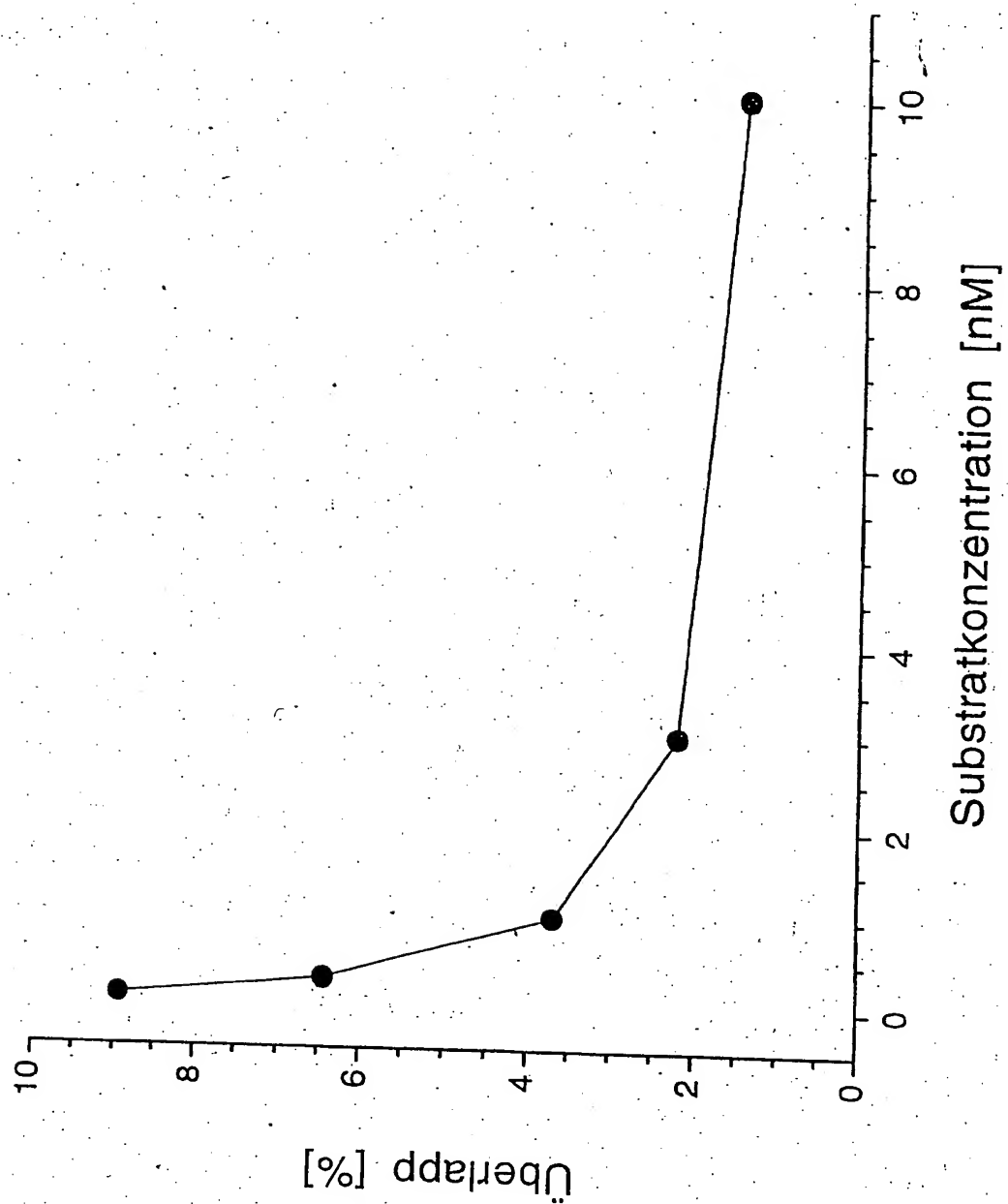
Figur 1



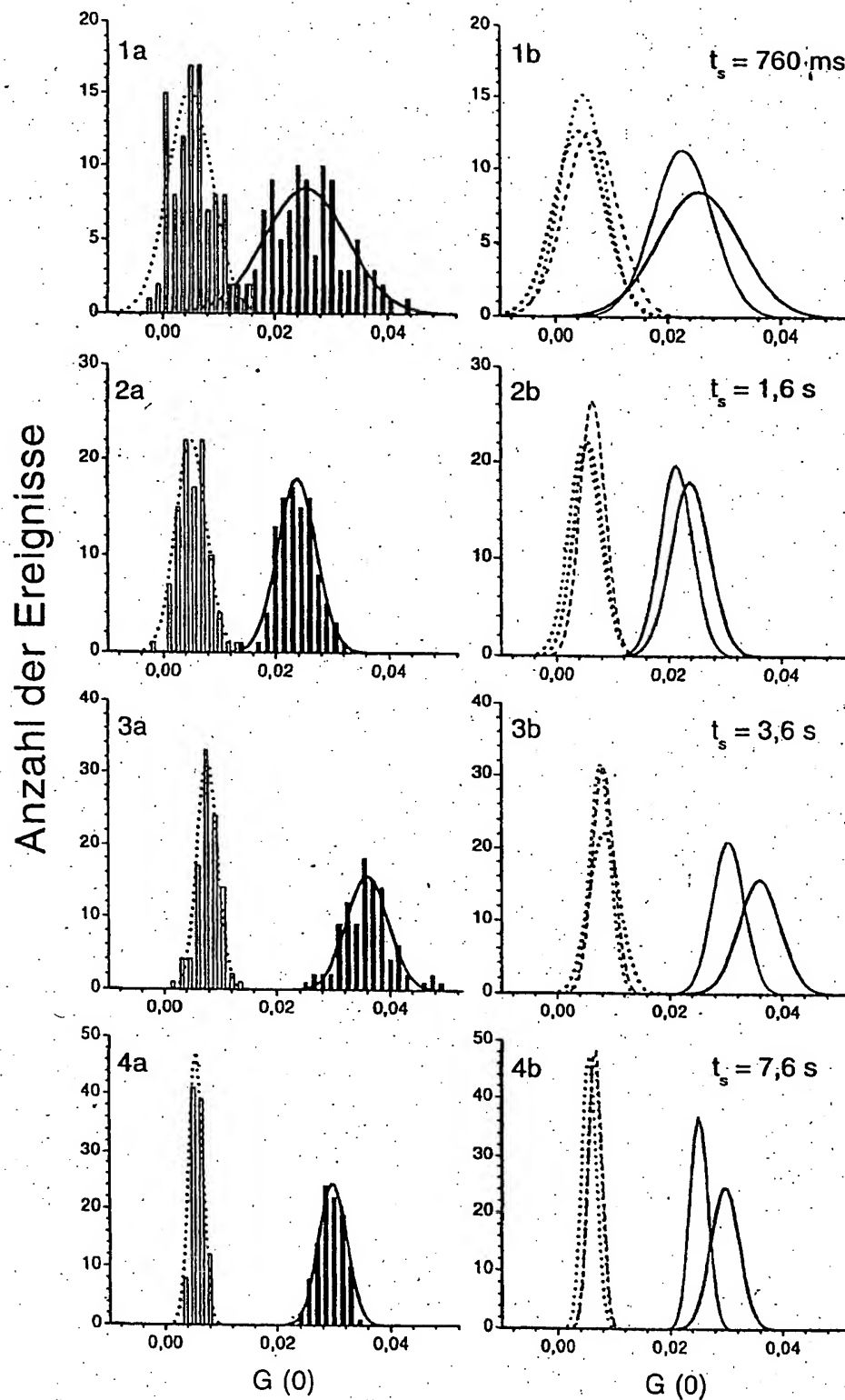
Figur 2



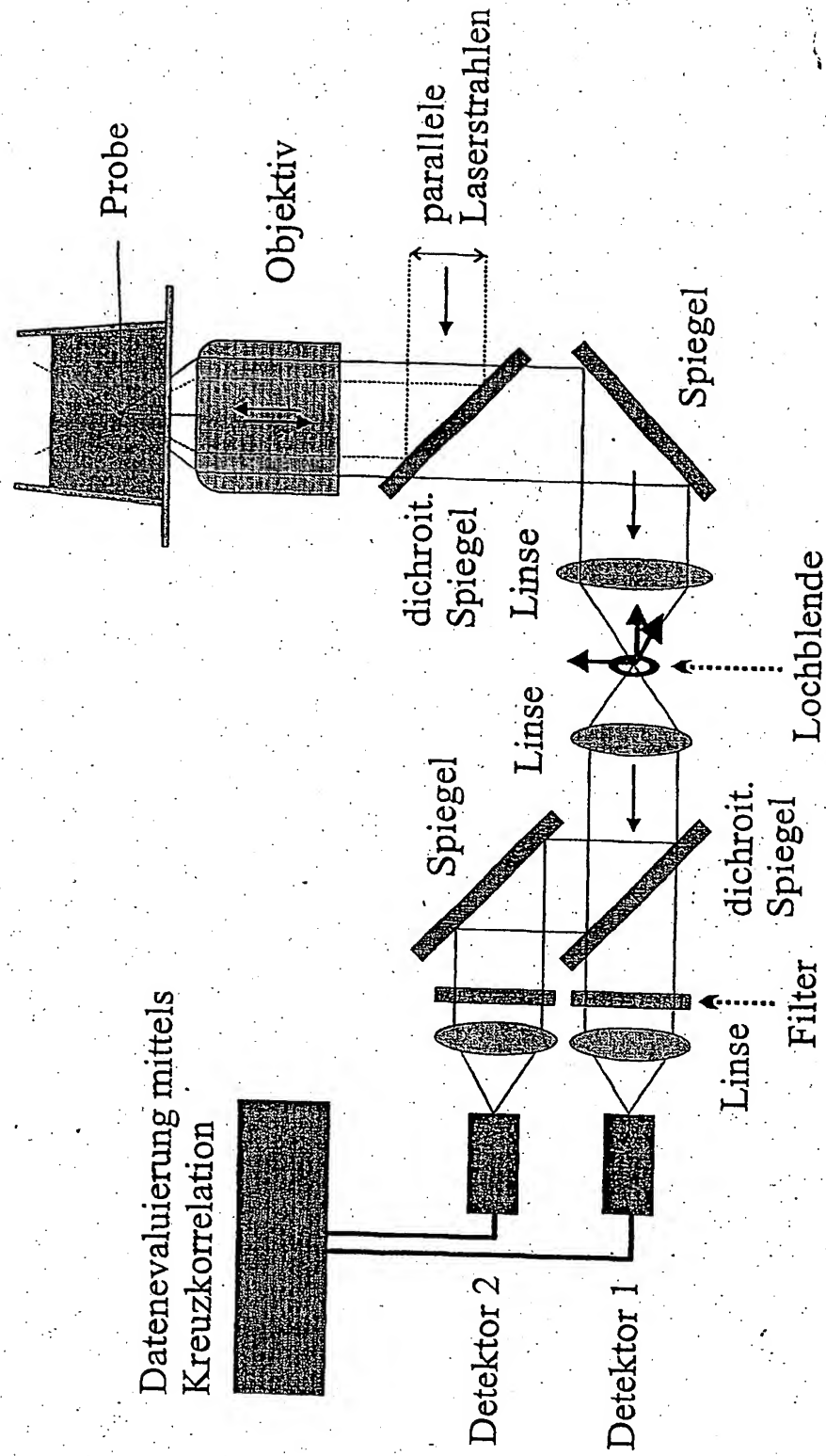
Figur 3



Figur 4



Figur 5



Figur 6